

па) и 20-м (III группа) суткам вместо 90-х суток в контроле (I группа). Гистологический анализ продемонстрировал, что через 90 суток темп дефибрирования ткани печени в III группе был существенно более выражен, чем во II группе. Полученный эффект можно объяснить тем, что разработанные клеточно-инженерные конструкции обеспечивают адекватные условия для пролонгированной жизнедеятельности трансплантированных клеток. Показатели IV группы животных не отличались от таковых, зарегистрированных в контрольной группе.

Макеев О.Г., Шуман Е.А., Коротков А.В.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕННО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ДЛЯ ТЕРАПИИ КОРОНАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»;
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Сосудистые заболевания и прежде всего ишемическая болезнь сердца и инсульт, являются одной из главных причин смертности взрослого населения промышленно развитых стран. Означенные заболевания связаны с геномобусловленным исключением долговременной адаптации в виде роста сосудов к локальной ишемии миокарда у большей части человеческой популяции, так как только у каждого четвертого пациента с сосудистой недостаточностью в сердце после 40 лет развиваются коллатеральные сосуды.

Перспективным направлением лечения коронарной недостаточности представляется разработка технологии генотерапии. Однако введение отдельных генов, как было показано в целом ряде плацебо-контролируемых исследований, не сопровождалось значимым клиническим эффектом. Неэффективность моногенной терапии обусловлена тем, что в образовании полноценной сосудистой сети принимают участие продукты, кодируемые более чем тридцатью генами.

Целью исследования явился поиск путей достижения полноценного неоангиогенеза за счет активации комплекса факторов роста, участвующих в ангиогенезе. Эксперименты проводили на кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,8-3,2 кг и возрастом 1-1,2 года. Эксперименты выполняли в соответствии «International guiding principles for biomedical research involving animals» разработанными Council for International Organizations of Medical Sciences (1985) и с одобрения Локального этического комитета ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. Животным в условиях внутривенного наркоза, с целью обеспечения неполной окклюзии передней нисходящей

артерии сердца выполняли ее перевязку на мандрене, сужавшей просвет сосуда на 80%. Двум опытным группам животных №1 (n=10) и №2 (n=10) сразу после наложения лигатуры интрамиокардиально однократно вводили встроенные в векторы гены факторов роста VEGF165 (Addgene plasmid 10909, группа №1) в концентрации 100 мкг/мл физиологического раствора, из расчета 50 мкг/см² зоны ишемии с шагом по площади зоны 2-10 мм равномерно по всей зоне ишемии или во второй группе одновременно однократно комплекс из четырех генов HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225 (Addgene plasmids 18949, 18956, 21306, 10909) в стехиометрическом соотношении 1:0,2:0,5:0,3, группа №2 в концентрации 400 мкг/мл физиологического раствора из расчета 200 мкг ДНК на см² зоны ишемии и шагом по площади 2-10 мм, с добавлением адыюванта. В качестве адыюванта использовали 2-диметиламиноэтанол в концентрации 2,5 ммоль/л. Контрольной группе животных (n=10) вводили только адыювант в соответствующем объеме физраствора. Уровень ангиогенеза оценивали на 30-е сутки после операции. Кровеносные сосуды и их взаимоотношения с сердечными мышечными волокнами выявляли с помощью метода внутрисосудистой инъекции контрастными взвесями с последующей гистологической обработкой. Изучение рО₂ в зоне повреждения на открытом сердце проводили полярографическим методом. Радиоактивность ткани после тугого заполнения сосудистого русла раствором уксуснокислого уранила-238 определяли на сцинтилляционном счетчике ГСУ-1М и выражали в кБк на грамм ткани (сухой вес). Дополнительно спустя 30 суток животным проводили фармакологическую нагрузочную пробу с дипиридамолом в суммарной дозе из расчета 0,75 мг на 1 кг массы тела 0,5% раствора и снимали электрокардиограмму.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel с использованием критерия студента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что трансфекция только геном VEGF-165 сопровождается развитием микроциркуляторного русла и повышением рО₂ в зоне ишемии по сравнению с контрольной группой животных. Вместе с тем наблюдался выраженный периваскулярный отек, сопровождающийся «схлопыванием» сосуда.

Трансфекция клеток комбинацией четырех генов факторов роста сосудов оказывает более выраженный эффект, чем трансфекция только геном VEGF-165. Кроме того, наряду с формированием капиллярной сети, трансфекция комбинацией факторов роста сосудов сопровождается образованием артериол, а также формированием анастомозов между новообразованными сосудами и сосудами неповрежденной ишемией ткани сердца. При формировании полноценного сосудистого русла наблюдается нормализация метаболических процессов в зоне поврежденного миокарда, о чем свидетельствует динамика изменения электрокардиограммы (ЭКГ) в ходе выполнения нагрузочной пробы. Анализ ЭКГ после введения вектора с геном VEGF165 спустя 5 минут нагрузки (проба с дипиридамолом) указывает на появление горизонтальной депрессии сегмента ST (V4) на 0.3 мВ (3 мм,

признак ишемии миокарда). При введении комплекса векторов с генами HIF1a, HIF1b, VEGF165, VEGF225 в стехиометрическом соотношении 1:0,2:0,5:0,3 наблюдается отрицательная ЭКГ проба — отсутствие депрессии сегмента ST.

Заключение

Таким образом, использование встроенных в векторы комплекса четырех генов в стехиометрическом соотношении 1/0.2/0.5/0.3 позволяет эффективно стимулировать ангиогенез и ремоделировать сосудистую сеть в ишемизированном миокарде. В свою очередь, эпигеномная локализация генных конструкторов и ограниченный срок пребывания в клетке являются достаточными для экспрессии вводимых генов и формирования полноценной сосудистой сети.

***Мелехин В.В., Десятова М.А., Пономарев А.И.,
Макеев О.Г.***

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА KLOTNO ПОДАВЛЯЕТ РОСТ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ РАБДОМИОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»;
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Недостаточная эффективность современных подходов к диагностике и лечению злокачественных новообразований обуславливает высокую актуальность проблемы разработки принципиально новых подходов, нацеленных на борьбу с онкопатологией.

Настоящие исследования являются попыткой оценки влияния гиперэкспрессии гена KLOTNO (KL) на жизнеспособность культивируемых клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека *in vitro*.

Исследования проведены на линии клеток Rd, в которых, посредством невирусной генетической конструкции (Addgene plasmid, 17713), моделировали гиперэкспрессию секреторируемой формы KL. В качестве оценки жизнеспособности исследуемых клеточных культур использовали МТТ-тест. В клетках также определяли уровни ферментативной активности митохондриальных оксидоредуктаз, лактатдегидрогеназ (ЛДГ) и ферментов

апоптоза, относящихся к семейству каспазы. Кроме того, с использованием радиоактивно меченого предшественника нуклеотидов (3Н-тимидин) исследована интенсивность синтеза ДНК. Результаты МТТ-теста, проведен-